



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com

RNAmisi microRNA快速提取试剂盒

(目录号: ZP416)

ZOMANBIO

为生命科学研究探索提供每一款好的产品

北京庄盟国际生物基因科技有限公司
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.

Order: 010-6261-7225

Free Phone: 400-611-2007

Technical: 010-6297-9301

Fax: 010-6296-8805

Email: zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com

实验室使用，仅用于科研
北京庄盟国际生物基因科技有限公司
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.

目录编号	包装单位
ZP416-01	50次

■ 适用范围：

适用于快速提取各种细胞组织miRNA和其它各种小RNA

■ 试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50次
Lysis/Binding buffer	4°C避光	50 ml
70%乙醇	室温	9ml RNase-free H ₂ O 第一次使用前按说明加指定量乙醇
Wash Solution 1	室温	12 ml 第一次使用前加入28ml无水乙醇
Wash Solution 2/3	室温	10 ml 第一次使用前加入42ml无水乙醇
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml
吸附柱RA和收集管	室温	50套
microRNA吸附柱MA和收集管	室温	50套

本试剂盒按照指示储存6个月不影响使用效果。

■ 储存事项：

1. Wash Solution 1和Wash Solution 2/3加入无水乙醇后，可以在常温保存一个月，如果要更长时间保存，请存放在4°C，**但是使用前，应该先恢复到室温。**
2. Wash Solution 2/3可能加入乙醇使用几天后出现沉淀晶体，并不影响使用，直接不吸晶体，吸上清使用就可以。
3. 运输在常温下进行，不影响使用效果。
4. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

■ 产品介绍：

近年来对RNA干扰和调节性小RNA的广泛研究迫切需要一种能有效提取15~30核苷酸左右大小RNA（包括siRNA和miRNA）的试剂盒。但是传统的RNA提取方法如硅胶膜不能有效吸附回收，酚/胍抽提和乙醇沉淀并不能有效沉淀回收微小分子RNA。本试剂盒采用独特的裂解液/ β -巯基乙醇迅速裂解细胞和灭活细胞RNA酶，强烈有机抽提去除蛋白和DNA，RNA包括微小分子RNA吸附于离心柱内特殊硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗-离心的步骤，漂洗液将细胞代谢物，蛋白等杂质进一步去除，最后低盐的洗脱液将纯净RNA从硅基质膜上洗脱。

■ 产品特点：

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 也不需要乙醇沉淀等容易丧失微小分子RNA的步骤。
3. 快速，简捷，单个样品操作一般可在30分钟内完成。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD₂₆₀/OD₂₈₀典型的比值达1.9~2.0，基本无DNA残留，可用于RNAi，RT-PCR，Northern-blot和各种实验。

■ 注意事项：

1. **第一次使用前请先在70%乙醇、Wash Solution 1瓶和Wash Solution 2/3瓶中加入指定量乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！**

2. **所有的离心步骤均在室温完成**，使用转速可以达到13,000 rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。

3. 需要自备乙醇，氯仿，一次性注射器，研钵。

4. **Lysis/Binding buffer 和Wash Solution 1含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**

5. 预防RNase 污染，应注意以下几方面：

1) 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致RNase 污染。

2) 使用无RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染。

3) RNA 在裂解液中时不会被RNase 降解。但提取后继续处理过程中应使用不含RNase 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在150℃烘烤4小时，塑料器皿可在0.5 M NaOH 中浸泡10 分钟，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除RNase。

4) 配制溶液应使用无RNase 的水。（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入DEPC 至终浓度0.1% (v/v)，37℃放置过夜，高压灭菌。）

6. RNA 纯度及浓度检测：

完整性：RNA 可用普通琼脂糖凝胶电泳（电泳条件：胶浓度1.2%；0.5×TBE电泳缓冲液；150v，15 分钟）检测完整性。由于细胞中70%-80%的RNA 为rRNA，电泳后UV 下应能看到非常明显的rRNA 条带。动物rRNA 大小分别约为5 kb 和2kb，分别相当于28S 和18S rRNA。动物RNA 样品中最大rRNA 亮度应为次大rRNA亮度的1.5-2.0 倍，否则表示RNA 样品的降解。出现弥散片状或条带消失表明样品严重降解。

纯度：OD260/OD280 比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的RNA，OD260/OD280 读数（10mMTris, pH7.5）在1.8-2.1 之间。OD260/OD280 读数受测定所用溶液的pH 值影响。同一个RNA 样品，假定在10mM Tris, pH7.5 溶液中测出的OD260/OD280 读数1.8-2.1 之间，在水溶液中所测读数则可能在1.5-1.9 之间，但这并不表示RNA 不纯。

浓度：取一定量的 RNA 提取物，用RNase-free 水稀释n 倍，用RNase-free水将分光光度计调零，取稀释液进行OD260, OD280 测定，按照以下公式进行RNA浓度的计算：终浓度（ng/μl）=（OD260）×（稀释倍数n）×40。

■ 操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

→ **提示：**第一次使用前请先在70%乙醇、Wash Solution 1瓶和Wash Solution 2/3瓶中加入指定量乙醇！

1. 组织培养细胞

a. 收集<107悬浮细胞到一个1.5ml离心管。（对于贴壁细胞，孔板培养和细胞瓶培养可以直接裂解，尽可能吸干净所有培养液残留后直接加入1ml的Lysis/Binding buffer, 迅速轻摇使Lysis/Binding buffer充分和瓶底所有细胞接触裂解细胞并灭活RNA酶，轻轻用移液枪反复吹打混匀接**操作步骤**项下3。）

b. 13,000rpm离心10秒（或者300g离心5分钟），使细胞沉淀下来。**完全吸弃上清**，留下细胞团，注意不完全弃上清会稀释裂解液导致产量纯度降低。

c. 轻弹管壁将细胞沉淀**完全松散重悬**，加入1ml Lysis/Binding buffer，涡旋或者吹打，充分裂解混匀。

d. 接**操作步骤**项下3。

2. 动物组织（例如鼠肝脑）

a. 新鲜组织用解剖刀迅速切成小碎块，根据处理组织的质量，按照50-100mg加入1ml的比例加入Lysis/Binding buffer后电动或者手动彻底匀浆。或者在液氮中研磨组织成细粉后，取适量组织细粉（约50-100mg）转入装有1ml Lysis/Binding buffer的1.5ml离心管中，剧烈吹打涡旋混匀。

b. **可选,一般不需要**:如果处理量大,有明显颗粒或者不溶物,非常粘稠或者裂解不充分,可立即用带针头的一次性 5 ml(约0.9mm针头) 注射器抽打裂解物 10 次或直到得到满意匀浆结果(或者电动匀浆30秒),可以剪切DNA,降低粘稠度和提高产量。

c. 接**操作步骤**项下3。

3. 室温放置5分钟以充分分离核酸蛋白复合物。

4. 加入200 μ l 氯仿,剧烈振荡15秒。

5. 室温放置2-3分钟, 13,000rpm离心10分钟。

6. 小心取上清(约600 μ l) 转入到新的离心管,加入1.5倍体积的无水乙醇(必须是室温的,通常900 μ l), 涡旋混匀。此时可能出现沉淀,但是不影响提取过程,立即吹打混匀,不要离心,立刻接下一步。

7. 将混合物(每次小于700 μ l,多可以分两次加入)加入一个吸附柱RA中,(吸附柱放入收集管中) 12,000 rpm离心30-60秒,弃掉废液。

8. 加700 μ l Wash Solution 1 (**请先检查是否已加入无水乙醇!**), 12,000rpm 离心30秒,弃掉废液。

9. 加入500 μ l Wash Solution 2/3 (**请先检查是否已加入无水乙醇!**), 12,000 rpm 离心30秒,弃掉废液。加入500 μ l Wash Solution 2/3,重复一遍。

10. 将吸附柱RA放回空收集管中, 13,000 rpm离心2分钟,尽量除去漂洗液,以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

11. 取出吸附柱RA,放入一个RNase free离心管中,根据预期RNA产量在吸附膜的中间部位加30-50 μ l RNase free water(事先在 100 $^{\circ}$ C水浴中预热效果更好), 室温放置1分钟, 12,000 rpm 离心1分钟。

12. 如果预期RNA产量>30 μ g,加30-50 μ l RNase free water重复步骤11,合并两次洗脱液,或者使用第一次的洗脱液加回到吸附柱重复步骤一遍(如果需要RNA浓度高)。

洗脱两遍的RNA洗脱液浓度高,分两次洗脱合并洗脱液的RNA产量比前者高15-30%,但是浓度要低,用户根据需要选择。

附: microRNA富集方法(仅仅提取microRNA,不包含>200 nt其它总RNA成份。)

1. 按照前面标准操作步骤1 - 5操作,直到得到上清。

2. 较精确估计上清体积(约600 μ l),加入等体积70%乙醇(**请先检查是否已加入无水乙醇!**)(必须是室温的),涡旋或者吹打充分混匀,不要离心。

3. 将混合物加入一个吸附柱RA中,(吸附柱放入收集管中) 12,000 rpm离心30-60秒, **收集滤过物**。将滤过物从收集管转移到一个新的离心管后,把吸附柱子放回空的收集管内,再加入剩下的混合物,离心, **收集滤过物**。合并两次滤过物,计算体积。

此时,滤过物含有microRNA,吸附柱子上面是除去了microRNA的总RNA(不包含microRNA),如果需要,可以按照前面标准操作步骤8 - 11操作漂洗,洗脱回收得到去除了microRNA的总RNA。

4. 较精确估计**滤过物体积**,加入0.65倍体积无水乙醇(必须是室温的),涡旋或者吹打充分混匀,不要离心。

5. 取一套新的**microRNA吸附柱MA**,将上一步骤混合物(每次小于700 μ l,多可以分两次加入)加入**microRNA吸附柱MA**中,(吸附柱放入收集管中) 12,000 rpm离心30秒,弃掉废液。

6. 按照前面标准操作步骤8 - 11操作漂洗,洗脱得到富集的microRNA。

注意:不同的实验可以选择不同的方法,例如Northern Blot或者表达芯片谱分析可以选择提取包括microRNA的总RNA。富集方法提取的microRNA因为去除了较大片段的mRNA和rRNA等,可能减少某些下游试验的扩增背景,当背景较高或者非特异扩增较多时,可以尝试使用富集方法提取的microRNA。